Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 144, S. 496—502 (1958)

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen
(Direktor: Prof. Dr. N. HENNING)

Untersuchungen zur Abhängigkeit einer gesteigerten Agglutinabilität der Erythrocyten von einzelnen Serumproteinfraktionen

Von
F. SCHEIFFARTH, W. FRENGER, G. BERG und V. EL RAHEB* X)

(Eingegangen am 19. Februar 1958)

BIBLIOTHEK

X) D29

1958 №104

Im Rahmen serologischer Untersuchungen haben in jüngerer Zeit eine Reihe von Hämagglutinationsreaktionen eine zunehmende praktische Bedeutung erlangt. Die klinische Verwertbarkeit ihrer Ergebnisse wird verschiedentlich jedoch durch Fehlresultate bzw. unspezifisch erhöhte Agglutinationstiter — bei den einzelnen Reaktionen in unterschiedlichem Grade — eingeengt.

Es ist eine empirisch gefestigte Tatsache, daß unspezifisch erhöhte Hämagglutinationstiter besonders in solchen Seren zu beobachten sind, bei denen sich eine erhebliche Störung in der Zusammensetzung der elektrophoretisch faßbaren Serumproteine im Sinne einer Dysproteinämie findet. Ob in solchen Fällen auch die proteingebundenen Kohlenhydrate und Fette eine Rolle spielen, läßt sich für die einzelnen Fälle nicht abschätzen. Daß gewisse Beziehungen zwischen Veränderungen der Serumproteine und erhöhter Hämagglutinabilität bestehen, zeigen im übrigen bekannte diagnostische Verfahren der Serologie, bei denen die Agglutination der Erythrocyten durch Zugabe eines beliebigen Proteins komplettiert wird, beispielsweise bei den Konglutinationsreaktionen. Außerdem vermag konzentriertes Plasma allein bereits sensibilisierte Erythrocyten zu agglutinieren[8]. Darüberhinaus gibt es Krankheitsgruppen, z. B. Erkrankungen der Leber und Carcinome, die bekanntlich mit erheblichen Verschiebungen innerhalb der Serumeiweißkörper einhergehen und bei denen mit einem erhöhten Prozentsatz falsch positiver Hämagglutinationsreaktionen zu rechnen ist.

Derartige Einzeltatsachen sind zwar aus Erfahrungsgründen bekannt. Jedoch sind systematische Untersuchungen über die Bedeutung der einzelnen Serumproteinfraktionen für eine gesteigerte Agglutinationsneigung der Erythrocyten unseres Wissens bisher nicht angestellt worden. Die nachfolgend angeführten Untersuchungen hatten daher zum Ziel, an Hand der Ergebnisse mehrerer Hämagglutinationsreaktionen an

* Beirut, Libanon; zur Zeit Gastarzt an der Med. Univ.-Klinik Erlangen.

einem unausgewählten Krankengut festzustellen, ob sich Beziehungen zwischen dem Agglutinationstiter einerseits und dem Serumgesamteiweiß sowie den einzelnen Serumproteinfraktionen andererseits feststellen lassen.

Material und Methodik

A. Kasuistik

Die Untersuchungen wurden an einem unausgewählten Krankengut von insgesamt 128 Fällen angestellt. Das Serum wurde jeweils nüchtern entnommen.

B. Methodik

I. Das entnommene Serum wurde mit folgenden Methoden auf seine hämagglutinierenden Eigenschaften geprüft:

1. Heterohämagglutination (nach Hanganutziu[6] sowie Deicher[2]) (Methode mit *unvorbehandelten* Erythrocyten). Im Prinzip wurde nach Inaktivierung des Serums bei 56° C im Wasserbad eine Serumverdünnungsreihe mit physiologischer NaCl-Lösung hergestellt und eine bestimmte Menge einer Hammelerythrocyten-Suspension den einzelnen Röhrchen zugesetzt. Nach Inkubation bei 37° C und bei + 4° C wurde der Hämagglutinationstiter abgelesen. Einzelheiten der Reaktion, die bekanntlich für die Diagnostik der infektiösen Mononukleose bedeutungsvoll geworden ist[10], dürfen als bekannt vorausgesetzt werden.

2. Hämagglutination mit tannierten Erythrocyten. (Vorbehandlung der Erythrocyten mit Tanninsäure). In Anlehnung an die Technik der passiven Hämagglutination nach Boyden[1] wurden Hammelerythrocyten mit einer hohen Tanninsäureverdünnung (1 : 20000) behandelt und dem hitzeinaktivierten Serum in der Verdünnungsreihe zugegeben. In Abwandlung der Boydenschen Technik unterblieb hier die Sensibilisierung der Erythrocyten mit dem spezifischen Antigen. Einzelheiten gehen aus dem Schrifttum hervor[1,14].

3. Hämagglutinationsreaktion nach Waaler[20] und Rose[12]. (Sensibilisierung der Erythrocyten.) Die Hämagglutinationsreaktion nach Waaler u. Rose hat für die primär-chronische Polyarthritis wesentliche diagnostische Bedeutung erlangt. Es handelt sich hierbei um eine Agglutination von Hammelerythrocyten in der Serumverdünnungsreihe, die mit einem spezifischen Immunserum (1 : 1000 verdünntes Antihammelerythrocyten-Kaninchenserum) sensibilisiert sind, wodurch die Agglutinationsneigung der Erythrocyten im Serummilieu erheblich gesteigert wird. Positive Ergebnisse dieser Reaktion fielen im besonderen bei der primär-chronischen Polyarthritis auf, weswegen der Reaktion hier eine diagnostische Bedeutung zukommt. Im allgemeinen geht diese Erkrankung mit sehr starken Verschiebungen in ihrem Proteinspektrum einher[3,15,16,18], weshalb die zu ihrer Diagnostik verwendete Reaktion nach Waaler u. Rose auch für unsere Fragestellung geeignet erschien.

Bezüglich der Einzelheiten dieser Methode sei auf die angegebenen Publikationen verwiesen[3,7,12,17,20]. Von einer Absorption der normalerweise vorhandenen Heteroagglutinine vor der eigentlichen Reaktion[17], wodurch diese für die primärchronische Polyarthritis sozusagen an „Spezifität" gewinnt, konnte in diesem Falle Abstand genommen werden. Die bei der Reaktion nachweisbaren auffallend hohen Hämagglutinationstiter sind der Fähigkeit der antierythrocytären Antikörper, die die Erythrocyten zusammenbringen und -halten, zuzuschreiben. Die sensibilisierten Erythrocyten haben die Eigenschaft, große hydrophile Moleküle zu adsorbieren[9].

Für die angeführten 3 *verschiedenen Hämagglutinationsreaktionen* galten folgende gleiche Bedingungen:

a) Die Reaktionen wurden zu gleicher Zeit im gleichen Serum angestellt. Das Serum war zuvor jeweils bei 56° C im Wasserbad komplementinaktiviert worden.

b) Die Reaktionen wurden 1 Std bei 37° C im Brutschrank und 12 Std bei 4° C im Kühlschrank gehalten. 30—60 min nach Entnahme aus dem Kühlschrank wurde der Agglutinationstiter abgelesen, dessen Höhe sich nach dem letzten, makroskopisch eben noch positiven Röhrchen richtete.

c) Als Pufferlösung für die Reaktionen wurde 0,85% ige NaCl-Lösung verwandt.

d) Von den Hammelerythrocyten wurde eine 2% ige Suspension hergestellt und in allen Fällen die gleiche Menge dieser Suspension (0,5 ml) zugesetzt.

Die Modelluntersuchungen wurden mit Hammelerythrocyten vorgenommen, da diese für diagnostische Verfahren der Serologie häufig Verwendung finden.

II. Das *Gesamteiweiß* im Serum wurde nach der Biuret-Methode bestimmt.

III. Die Analyse der Serumproteine erfolgte mit der *Papierelektrophorese*[5a]. Die Werte für die einzelnen Fraktionen wurden in g/100 ml angegeben.

IV. *Auswertung.* Es wurde geprüft, ob sich Beziehungen zwischen Gesamteiweiß und den einzelnen Serumproteinfraktionen einerseits und dem Hämagglutinationstiter der verschiedenen Reaktionen andererseits ergeben*.

Für die Auswertung wurde der Endtiter — bezogen auf 0,5 ml Serum — in dessen nat. Logarithmus (^{2}log) angegeben.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorgenommenen Untersuchungen sind in den nachfolgenden 3 Tabellen dargestellt.

1. Die Prüfung auf Abhängigkeiten zwischen *Gesamteiweiß und Proteinfraktionen einerseits und der Heterohämagglutination* (mit unbehandelten Erythrocyten) andererseits ergab die in der Tab. 1 angeführten Regressionskoeffizienten (b) und Bestimmtheiten (B).

Tabelle 1

Beziehung	Regress.-Koeffizient (b)	Bestimmtheit (B)	Sicherung (P)
Ges.-Eiweiß/Hämaggl.-Titer	0,3652	0,0465	0,05
Albumin/Hämaggl.-Titer	0,1528	0,0073	—
α_1-Globulin/Hämaggl.-Titer	0,0641	0,0000021	—
α_2-Globulin/Hämaggl.-Titer	—0,9540	0,0142	—
β_1-Globulin/Hämaggl.-Titer	—0,1829	0,0003	—
β_2-Globulin/Hämaggl.-Titer	2,7904	0,0254	—
γ-Globulin/Hämaggl.-Titer	0,4974	0,0463	0,05

In der Tabelle gibt der Regressionskoeffizient an, in welcher Größenordnung sich der Agglutinationstiter ($n_{\log/0,5\,ml}$) ändert, wenn das Gesamteiweiß oder die einzelnen Proteinfraktionen um 1 g/100 ml zunehmen. Für eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von 5% beträgt — bei N von 120 Freiheitsgraden — B 0,03184. In allen Fällen, in denen B diesen Wert überschreitet, ist demnach eine Abhängigkeit knapp gesichert und somit wahrscheinlich. Dies trifft also für die Beziehungen zwischen Hämagglutinationstiter einerseits und Serumgesamteiweiß sowie

* Alle hierbei verwandten statistischen Verfahren sind angeführt bei: A. Linder, Statistische Methoden für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure. Birkhäuser, Basel 1951.

γ-Globulin andererseits zu. Für alle anderen Proteinfraktionen lassen sich entsprechende Abhängigkeiten nicht sichern.

2. Die Untersuchungen auf *Abhängigkeiten zwischen Gesamteiweiß und Proteinfraktionen einerseits und der Hämagglutination mit tannierten Erythrocyten* andererseits weisen die in der folgenden Tab. 2 dargestellten Ergebnisse auf.

Tabelle 2

Beziehung	Regress.-Koeffizient (b)	Bestimmtheit (B)	Sicherung (P)
Ges.-Eiweiß/Hämaggl.-Titer	0,2581	0,0255	—
Albumin/Hämaggl.-Titer	0,0696	0,00164	—
α_1-Globulin/Hämaggl.-Titer	—0,7591	0,00332	—
α_2-Globulin/Hämaggl.-Titer	—1,7427	0,0520	0,05
β_1-Globulin/Hämaggl.-Titer	—0,4348	0,00195	—
β_2-Globulin/Hämaggl.-Titer	3,4158	0,0421	0,05
γ-Globulin/Hämaggl.-Titer	0,4601	0,0437	0,05

Im Hinblick auf die Ausführungen unter Tab. 1 ist also eine Abhängigkeit der Agglutination tannierter Erythrocyten von den α_2-, β_2- und γ-Globulinen feststellbar. Für alle anderen Fraktionen lassen sich keine Beziehungen aufzeigen.

3. Die Prüfung der *Abhängigkeiten zwischen Gesamteiweiß und Proteinfraktionen einerseits und dem Hämagglutinationstiter nach Waaler und Rose* (Methode mit sensibilisierten Erythrocyten) andererseits zeigt die nachfolgenden Ergebnisse (Tab. 3).

Tabelle 3

Beziehung	Regress.-Koeffizient (b)	Bestimmtheit (B)	Sicherung (P)
Ges.-Eiweiß/Hämaggl.-Titer	0,1642	0,0067	—
Albumin/Hämaggl.-Titer	—0,1073	0,00256	—
α_1-Globulin/Hämaggl.-Titer	—2,1886	0,01859	—
α_2-Globulin/Hämaggl.-Titer	—0,8660	0,00862	—
β_1-Globulin/Hämaggl.-Titer	—0,3196	0,0053	—
β_2-Globulin/Hämaggl.-Titer	0,1715	0,000078	—
γ-Globulin/Hämaggl.-Titer	0,0645	0,000557	—

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß sich Abhängigkeiten zwischen dem Hämagglutinationstiter der Waaler-Rose-Reaktion vom Serumgesamteiweiß oder einzelnen Serumproteinfraktionen *nicht* sichern lassen.

Diskussion

Wenn man die Ergebnisse kurz zusammenfaßt, so ist folgendes festzustellen:

I. Die *Hämagglutinationsreaktion nach Waaler und Rose* — ohne Absorption der Heterohämagglutinine vor der eigentlichen Untersuchung —

läßt im Verhalten ihres Titers *keine* Abhängigkeit vom Serumgesamteiweiß oder den einzelnen Serumproteinfraktionen erkennen.

II. Die Ergebnisse der *Heterohämagglutination* nach HANGANUTZIU und DEICHER weisen gesicherte Beziehungen zum Serumgesamteiweiß und zur γ-Globulinfraktion auf.

III. Die Agglutination tannierter Erythrocyten zeigt eine Abhängigkeit vom Verhalten der α_2-, β_2- und γ-Globuline des Serums. Während jedoch in allen Fällen eine Zunahme der betreffenden Serumfraktion auch eine Zunahme des Hämagglutinationstiters bedingt, läßt lediglich das α_2-Globulin in seiner Relation zum Agglutinationstiter tannierter Erythrocyten ein umgekehrtes Verhalten erkennen, d. h., wenn hier der Globulinwert zunimmt, nimmt der Hämagglutinationstiter ab.

Diese Ergebnisse lassen sich folgendermaßen diskutieren:

I. Wie bekannt, finden sich bei der Verwendung der *Hämagglutinationsreaktion nach Waaler und Rose* bei primär-chronischer Polyarthritis im allgemeinen relativ hohe Titerwerte, die noch weit höher ausfallen, wenn die bereits normalerweise in einem Serum vorhandenen Hämagglutinine vor der eigentlichen Reaktion — wie bei unserer Methodik — nicht entfernt werden. Die Methode ist deshalb als besonders empfindlich anzusehen, weil die Hammelerythrocyten durch Behandlung mit ihrem spezifischen, wenn auch verdünnten Antiserum eine besondere Agglutinationsbereitschaft aufweisen. Für die primär-chronische Polyarthritis wird diese Reaktion als relativ „spezifisch" angesehen. Der Einwand, daß ein erhöhter Hämagglutinationstiter durch eine im allgemeinen bei dieser Krankheit vorhandene Dysproteinämie, vor allem eine Hyper-γ-Globulinämie, bedingt ist, trifft auf Grund unserer Untersuchungsergebnisse nicht zu. Wie oben ausgeführt, lassen sich keine Abhängigkeiten zwischen dem Hämagglutinationstiter und dem Serumgesamteiweiß sowie den einzelnen Proteinfraktionen sichern (Tab. 3).

Diese Tatsache gewinnt über das rein Experimentelle hinaus auch klinische Bedeutung vor allem deshalb, weil demnach die Waaler-Rose-Reaktion für die primär-chronische Polyarthritis an diagnostischer Beweiskraft gewinnt. In diesem Sinne sprechen übrigens auch die klinisch-serologischen Befunde im Krankheitsverlaufe, wonach unter der Prednison-Behandlung zwar die Hyperglobulinämie, insbesondere die γ-Globuline, sehr deutlich reduziert werden, der Hämagglutinationstiter praktisch jedoch unbeeinflußt bleibt[13].

Über die Bedeutung der Glucoproteide, die bei der primär-chronischen Polyarthritis erhöht gefunden werden[16], für den Ausfall der Hämagglutinationsreaktion soll in einer späteren Mitteilung berichtet werden.

II. Eine Vermehrung der *Heterohämagglutinine*, die mit der Methode von HANGANUTZIU und DEICHER nachgewiesen werden, findet sich außer bei der

infektiösen Mononukleose auch bei anderen Krankheitsgruppen, ja auch nach Impfungen mit einer vom Tier stammenden Substanz. Sie hat daher für praktische Belange als ganz unspezifische Untersuchungstechnik zu gelten. Bezeichnenderweise läßt sich bei dieser Reaktion — wie aus den Ergebnissen zu ersehen ist — eine Abhängigkeit zwischen Agglutinationstiter und der γ-Globulinfraktion des Serums sichern, d. h., wenn die γ-Globuline zunehmen, erhöht sich auch der Agglutinationstiter. Auch die nachweisbare Beziehung zwischen Agglutinationstiter und Serumgesamteiweiß ist durch die γ-Globulinfraktion bedingt (Tab. 1). Dieser Einfluß der γ-Globulinfraktion kann teilweise durch die Natur der Agglutinine, die sich elektrophoretisch wie γ-Globuline verhalten[4], bedingt sein. Es ist daher nicht zu entscheiden, inwieweit der Hauptteil der γ-Globuline, die keine Agglutinine darstellen, für einen positiven Reaktionsausfall von Bedeutung ist.

III. Boyden hat die passive Hämagglutinationsreaktion gegenüber der Technik von Middlebrook u. Dubos[11] insofern modifiziert, als er der eigentlichen Sensibilisierung der Erythrocyten eine *Behandlung mit Tanninsäure* voranstellte. Die Reaktion gewann hierdurch an Empfindlichkeit, aber die Möglichkeit von Fehlresultaten schien damit auch zuzunehmen.

Unsere Ergebnisse mit tannierten Erythrocyten zeigen gegenüber den Resultaten der gewöhnlichen Heterohämagglutination, also mit unvorbehandelten Erythrocyten, daß nicht nur eine Abhängigkeit von den γ-Globulinen des Serums, sondern auch von den β_2- und α_2-Globulinen besteht. Während eine Zunahme der β_2- und γ-Globulinfraktion mit einer Erhöhung des Agglutinationstiters einhergeht, bedingt die Zunahme der α_2-Fraktion eine Abnahme des Hämagglutinationstiters (negative Regression). Demnach scheinen die β_2- und γ-Globuline die Agglutination tannierter Erythrocyten zu begünstigen, die α_2-Globuline sie jedoch zu hemmen. Auch hier gilt für das elektrophoretische Verhalten der Agglutinine und ihrer Abhängigkeit von der γ-Globulinfraktion das oben Gesagte, d. h. die Beziehung bei den γ-Globulinen kann zum Teil durch die Agglutinine selbst bedingt sein. Wie weit für diese aufgezeigten Befunde, vor allem bei den α_2-Globulinen, proteingebundene Fette und Kohlenhydrate verantwortlich zu machen sind, bleibt zunächst noch offen.

Zusammenfassung

Es werden Untersuchungsergebnisse über die Beziehungen zwischen dem Ausfall von Hämagglutinationsreaktionen und der Höhe der Serumproteine berichtet. Dabei zeigte sich, daß die Hämagglutinationsreaktion nach Waaler-Rose keine unmittelbaren Beziehungen zu den Serumeiweißkörpern besitzt. Dagegen weist die Heterohämagglutinationsreaktion nach Hanganutziu und Deicher zum Serumgesamteiweiß und zu der γ-Globulinfraktion, die Agglutination tannierter Erythrocyten zu den α_2-, β_2- und γ-Globulinen gesicherte Beziehungen auf.

Diese Untersuchungsergebnisse sind für die Bewertung des Ausfalles der genannten Hämagglutinationsreaktionen für klinische Belange in Rechnung zu stellen.

Literatur

[1] Boyden, S. V.: The Adsorption of Proteins on Erythrocytes treated with Tannic acid and subsequent Hemagglutination by Antiprotein Sera. J. exp. Med. **93**, 107 (1951). — [2] Deicher, H.: Über die Erzeugung heterospezifischer Hämagglutinine durch Injektion artfremden Serums. Z. ges. Hyg. **106**, 561 (1926). — [3] Dickgiesser, F., u. F. Harter: Über die zur serologischen Diagnose der chronischen Polyarthritis angewandte Agglutinationsreaktion mit sensibilisierten Erythrocyten. Z. ges. exp. Med. **122**, 221 (1953/54); **124**, 501 (1954). — [4] Frenger, W.: Die elektrophoretische Lokalisation des heterophilen menschlichen Serumagglutinins. Z. ges. Hyg. **144**, 215 (1957). — [5] Gamp, A.: Untersuchungen über das Verhalten eiweißgebundener Kohlenhydrate bei rheumatischen Erkrankungen. Z. Rheumaforsch. **14**, 167 (1955). — [5a] Grassmann, W., K. Hannig u. M. Knedel: Über ein Verfahren zur elektrophoretischen Bestimmung der Serumproteine auf Filtrierpapier. Dtsch. med. Wschr. **1951**, 333. — [6] Hanganutziu, M.: Hémagglutinines hétérogénétiques après injection de sérum de cheval. C. R. Soc. Biol. (Paris) **91**, 1457 (1924). — [7] Jacqueline, F., A. Eyquem et E. Jochem: Valeur des réactions d'agglutination des globules rouges sensibilisés par un immunserum au cours des rhumatismes inflammatoires chroniques. Rev. Rhum. **23**, 115 (1956). — [8] Jandl, J. H.: Sequestration by the spleen of red cells sensitized with incomplete antibody and metalloprotein complexes. J. clin. Invest. **34**, 912 (1955). — [9] Jandl, J. H., and W. B. Castle: Agglutination of sensitized red cells by large anisometric molecules. J. Lab. clin. Med. **47**, 669 (1956). — [10] Lippelt, H., u. J. Nogalski: Die Hetero-Hämagglutination. Z. ges. Hyg. **136**, 177 (1953). — [11] Middlebrook, G., and R. J. Dubos: Spezific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of tubercle bacilli. J. exp. Med. **88**, 521 (1948). — [12] Rose, H. M., Ch. Ragan, E. Pearce and M. O. Lipman: Differential agglutination of normal and sensitized sheep erythrocytes by sera of patients with rheumatoid arthritis. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **68**, 1 (1948). — [13] Scheiffarth, F.: Die Bedeutung der Antistreptolysinreaktion und der Waaler-Rose-Reaktion bei akuter und chronischer Polyarthritis. Z. Rheumaforsch. **16**, 352 (1957). — [14] Scheiffarth, F., u. W. Frenger: Die Verwendbarkeit der passiven oder indirekten Hämagglutinationsreaktion nach Boyden beim Nachweis von Antikörpern. Blut **2**, 102 (1956). — [15] Schlegel, B., u. T. Behrend: Die klinische Bedeutung der serologischen Reaktionen bei rheumatischen Erkrankungen. Z. Rheumaforsch. **16**, 183 (1957). — [16] Schmid, J., E. Pätzold u. R. Fink: Die Protein-, Lipoid- und Kohlehydratelektrophorese bei der primär chronischen Polyarthritis. Wien. Z. inn. Med. **36**, 501 (1955). — [17] Svartz, N., u. K. Schlossmann: En ny serologisk reaktion vid kronisk polyarthrit. Nord. med. T. **42**, 1390 (1949). — [18] Svartz, N.: Eine für den chronischen Gelenkrheumatismus charakteristische Substanz im Blute und in der Gelenkflüssigkeit. Bull. schweiz. Akad. med. Wiss. **12**, 99 (1956). — [19] Tischendorf, W.: Dysproteinämische Osteo-, Arthro-, Myopathien. Z. Rheumaforsch. **10**, 302 (1951). — [20] Waaler, E.: On the occurence of a factor in human serum activating the spezific agglutination of sheep blood corpuscules. Acta path. microbiol. scand. **17**, 172 (1940).

Prof. Dr. F. Scheiffarth, Dr. W. Frenger, Dr. G. Berg, Dr. V. el Raheb
Medizinische Universitätsklinik Erlangen